

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/13, A61K 31/70, 48/00, C12N 5/10</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 98/31808</b> (43) Date de publication internationale: 23 juillet 1998 (23.07.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/00081 (22) Date de dépôt international: 16 janvier 1998 (16.01.98)		(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Données relatives à la priorité: 97/00540 20 janvier 1997 (20.01.97) FR		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75015 Paris (FR).			
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): PIECHACZYK, Marc [FR/FR]; 123, rue des Erables, F-34980 Saint Gély du Fesc (FR). NOEL, Danièle [FR/FR]; 8, rue Yves Montand, F-34830 Clapiers (FR).			
(74) Mandataire: BREESE-MAJEROWICZ; 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).			
(54) Title: BIOLOGICAL MATERIAL FOR TREATING A MAMMAL BY ANTIBODY GENE TRANSFER AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING SAME			
(54) Titre: MATERIEL BILOGIQUE POUR LE TRAITEMENT D'UN MAMMIFERE PAR TRANSFERT DE GENE D'ANTICORPS ET COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LE CONTENANT			
(57) Abstract			
<p>The invention concerns a biological material for preparing a pharmaceutical compositions for treating a mammal by gene transfer, comprising, either at least a nucleic acid sequence containing a therapeutic gene and in a form enabling <i>in vivo</i> transfer of said gene into the cells of the mammal, or at least one cell of the mammal not naturally producing antibodies, genetically modified <i>in vitro</i> by at least a previous nucleic acid sequence, and in a form enabling its incorporation into the mammal's system as well as optionally its previous culture. The invention is characterised in that said nucleic acid sequence contains an antibody gene and elements for expressing <i>in vivo</i> said antibody gene and the secretion in the blood circulation of a mammal a therapeutically effective amount of this antibody or a fragment of it, by cells of said mammal genetically modified by said nucleic acid sequence and not naturally producing antibodies. The invention also concerns the pharmaceutical compositions containing this biological material.</p>			
(57) Abrégé			
<p>L'invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène, comprenant, soit au moins une séquence d'acides nucléiques contenant un gène thérapeutique et se présentant sous une forme permettant le transfert <i>in vivo</i> dudit gène dans des cellules de mammifère, soit au moins une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement des anticorps, génétiquement modifiée <i>in vitro</i> par au moins une séquence d'acides nucléiques précédente, et se présentant sous une forme permettant son incorporation dans l'organisme d'un mammifère ainsi qu'éventuellement sa culture préalable, caractérisé en ce que ladite séquence d'acides nucléiques contient un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression <i>in vivo</i> dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps. L'invention concerne aussi les compositions pharmaceutiques comprenant ce matériel biologique.</p>			

***UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION***

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizstan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

MATÉRIEL BIOLOGIQUE POUR LE TRAITEMENT D'UN  
MAMMIFÈRE PAR TRANSFERT DE GÈNE D'ANTICORPS ET  
COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LE CONTENANT.

5           La présente invention concerne le domaine de la thérapie génique consistant à transférer dans les cellules d'un sujet au moins un gène codant pour une protéine thérapeutique. Plus particulièrement, l'invention concerne le transfert, dans des cellules ne produisant pas naturellement des anticorps, de séquences d'acide nucléique codant pour tout ou partie ou dérivé d'anticorps thérapeutiques impliquant une composante protéique participant à l'effet thérapeutique, de sorte que les cellules génétiquement modifiées par ces 10 séquences d'acide nucléique et implantées chez un sujet produisent et sécrètent dans la circulation sanguine dudit sujet une quantité thérapeutiquement efficace de 15 cet anticorps.

20           La thérapie génique consiste à corriger la déficience d'un gène en introduisant, dans les cellules où la déficience dudit gène est cause d'une pathologie, une séquence d'ADN portant l'information génétique permettant de remédier la déficiente. Les perspectives d'application de la thérapie génique dans le domaine des maladies génétiques sont nombreuses et l'on peut citer 25 par exemple les corrections des thalassemies, de la drépanocytose, des déficits du métabolisme hépatique, de la mucoviscidose, des myopathies, etc ... (W. F. Anderson, 256, 808, 1992 ; R. C. Mulligan, Science, 260, 926, 1993 ; D. Miller, Nature, 357, 455, 1992 ; R. Morgan et W. F. Anderson, Ann. Rev. Biochem., 62, 191, 30 1993 ; B. Dodet, Biofutur, Mai 1992).

35           Mais la thérapie génique permet aussi de lutter contre des maladies qui ne relèvent pas exclusivement d'une déficience génétique, tels que des

cancers ou des infections virales, en introduisant dans les cellules de l'organe ou du tissu atteint un gène codant pour une protéine ou un ARN thérapeutique. De telles substances thérapeutiques sont par exemple des cytokines, des anticorps intracellulaire, des variants de protéines virales, des ARNs antisens, des ribozymes, etc ....

Les techniques permettant l'introduction de l'information génétique dans des cellules sont décrites dans la littérature. Deux approches principales peuvent cependant être envisagées.

La première consistant à introduire la séquence d'ADN portant l'information génétique directement *in vivo* dans les cellules des organes ou tissus cibles de la thérapie ou dans des cellules d'organes ou de tissus chargés de produire la substance thérapeutique, soit au voisinage du lieu de production, soit de façon systémique.

La seconde, relevant de la thérapie cellulaire et dite *ex vivo*, consiste à prélever des cellules d'un sujet, à modifier ces cellules *in vitro* en y introduisant la séquence d'ADN portant l'information génétique que l'on souhaite transférer, puis à réintroduire les cellules ainsi modifiées dans l'organisme du sujet. Cette stratégie thérapeutique est par exemple décrite dans le brevet américain N°. 5 399 346.

Les séquences d'ADN portant l'information génétique que l'on souhaite introduire dans les cellules sont associés fonctionnellement à des séquences d'ADN permettant leur expression *in vivo* et peuvent se présenter sous plusieurs formes :

- Dans le cas d'un transfert de gène directement *in vivo* selon la première approche envisagée ci-dessus, elles peuvent être utilisées sous forme :

5 . libre, c'est à dire transférées sous forme d'ADN nu, comme un plasmide ou un fragment de restriction, notamment par injection *in vivo* dans les cellules, comme décrit dans la demande de brevet internationale publiée sous le numéro WO 90 11 092;

10 . complexée ou associée à d'autres molécules favorisant leur entrée dans les cellules eucaryotes comme la lipofectin, le transfectace, le transfectam, la polyéthylénimmine, etc ...;

15 . incorporée dans un vecteur viral, lequel sera introduit directement *in vivo* dans les cellules de l'organe ou du tissu cible par infection.

20 - Dans le cas d'un transfert de gène selon la seconde approche envisagée précédemment, dite *ex vivo*, la séquence d'ADN est intégrée *in vitro* dans des cellules qui sont ensuite introduites dans l'organisme du sujet; il peut s'agir alors par exemple de cellules souches hématopoïétique, de lymphocytes T, d'hépatocytes etc... Dans ce cas, les cellules génétiquement modifiées 25 *in vitro* par la séquence d'ADN, selon les techniques décrites ci-dessus pour une introduction directement *in vivo*, peuvent avoir été prélevées du sujet traité ou provenir d'un autre sujet humain ou animal comme le porc (E. Cozzi et D. J. G. White, *Nature Genetics*, 1, 964-965, 1995).

30 Parmi, les substances capables d'interférer avec une pathologie et que l'on cherche à produire dans l'organisme du patient pour une thérapie génique, on peut citer certains antigènes ou anticorps.

35 L'expression de séquences d'ADN codant pour des protéines antigéniques vise à permettre la production, par les cellules génétiquement modifiées par cet ADN, d'antigène susceptibles d'induire une immunisation de l'individu. Une telle stratégie de vaccination a par exemple été mise en oeuvre dans le cas

de divers pathogènes dont le virus de la grippe (Tang, D., De Vit, M., et Johnston, *Nature*, 356, 152-154, 1992).

La production *in vitro* d'anticorps, de fragments d'anticorps ou de dérivés d'anticorps tels que des anticorps chimériques, par génie génétique dans des cellules eucaryotes a également déjà été décrite, par exemple dans les brevets européens publiés sous les numéros 120 694 et 125 023. L'injection à des patients d'anticorps thérapeutiques vise à cibler des antigènes impliqués dans une pathologie afin de neutraliser soit directement, soit par le biais d'une cascade d'événements métaboliques ou immunitaires, l'un des agents causals de la maladie. On peut citer comme exemples de telles stratégies thérapeutiques, le traitement ou la prévention de lymphomes B (Yefenof, E., Picker, L. I., Scheuermann, R. N., Vitetta, E. S., Street, N. E., Tucker, T., Uhr, J. W., *Current Opinion in Immunology*, 5, 740-744, 1993).

La demande de brevet internationale publiée sous le numéro WO 94 29 446 décrit l'expression intracellulaire de séquences d'ADN codant pour des anticorps. Cette approche permet d'envisager une thérapie génique directement *in vivo* de pathologie impliquant des composants cellulaires non accessibles par les méthodes de vaccination traditionnelles ou fondée sur la production *in vivo* d'antigènes recombinants. Les séquences d'ADN exprimées par les cellules génétiquement modifiées selon la méthode décrite dans la demande de brevet internationale WO 94 29 446 sont donc essentiellement caractérisées par le fait qu'elles comprennent un gène d'anticorps modifié de façon à ce que l'anticorps ne soit pas sécrété.

La présente invention vise au contraire à réaliser l'expression *in vivo* de gènes d'anticorps par

des cellules qui sécrèteront lesdits anticorps dans la circulation sanguine du mammifère porteur des cellules génétiquement modifiées par le gène d'anticorps.

Cette invention est fondée sur la mise en évidence que divers types cellulaires, autres que ceux produisant naturellement des anticorps sont capables, après modification génétique, de produire de manière stable *in vivo* des anticorps.

En effet, les plasmocytes, qui sont les cellules spécialisées pour la production d'anticorps, constituent de mauvais candidats pour la production à long terme d'anticorps thérapeutiques par transfert de gènes; les plasmocytes ont une durée de vie réduite, de l'ordre de quelques jours, et le fait qu'ils produisent déjà un autre anticorps est de nature à conduire à des associations ou des recombinaisons entre les chaînes de l'anticorps naturellement produit et l'anticorps exprimé par le gène transféré, ce qui est hautement préjudiciable à l'effet thérapeutique recherché. Il était donc important de montrer que des types cellulaires non spécialisés pour la production naturelle d'anticorps étaient susceptibles d'accepter un transfert de gène, d'exprimer *in vivo* un anticorps thérapeutique et de sécréter des niveaux soutenus avantageusement régulés d'anticorps dans la circulation sanguine d'un mammifère.

En conséquence, la présente invention concerne un matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène, comprenant :

- soit au moins une séquence d'acide nucléique contenant un gène thérapeutique et se présentant sous une forme permettant le transfert *in vivo* dudit gène dans des cellules de mammifère,

- soit au moins une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement des anticorps, génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique précédente, et se présentant sous une forme permettant son implantation dans l'organisme d'un mammifère ainsi qu'éventuellement sa culture préalable,

le<sup>dit</sup> matériel biologique étant caractérisé par le fait que ladite séquence d'acide nucléique contient un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps.

Par séquence d'acides nucléiques, on entend aussi bien des séquences d'ADN ou d'ARN ou des séquences contenant des nucléotides modifiés.

La séquence d'acides nucléiques entrant dans la composition du matériel biologique de l'invention comprend :

- au moins un gène d'anticorps thérapeutique, c'est à dire un gène codant pour un anticorps natif non modifié donc naturel, ou un fragment d'anticorps, tels que les fragments Fab ou F(ab)'2 ou les fragments ScFv, ou encore un dérivé d'anticorps comme un anticorps chimérique ou un anticorps ou fragment d'anticorps fusionné à une substance effectrice par exemple une toxine ou une hormone;

- au moins un élément assurant l'expression du gène précédent; il s'agit de séquences promotrices de la transcription placées en amont du gène d'anticorps et

contrôlant son expression dans les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps.

Outre le gène d'anticorps et son promoteur, la séquence d'acides nucléiques peut comprendre une 5 séquence de terminaison de la transcription, située en aval du gène d'anticorps et permettant la sécrétion du produit du gène d'anticorps dans la circulation sanguine du mammifère dont des cellules ont été génétiquement modifiées par la séquence d'acides nucléiques.

10 Le promoteur utilisé peut être tout promoteur permettant une expression efficace du gène qu'il contrôle dans le type cellulaire génétiquement modifié par la séquence d'acides nucléiques. Il peut ainsi être un promoteur viral, un promoteur ubiquitaire 15 ou spécifique de tissu ou encore un promoteur synthétique.

10 Selon une première forme de réalisation, le matériel biologique de l'invention comprend une séquence 15 d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas 25 naturellement des anticorps, ladite séquence se présentant sous la forme d'une séquence d'ADN ou d'ARN 30 nucléique. On entend plus particulièrement par séquence d'ADN nucléique un plasmide, mais il peut aussi s'agir de tout autre forme d'ADN tel qu'un fragment de restriction. Une composition pharmaceutique à base de ce matériel biologique peut être administrée à un individu par injection ou électroporation localisée; elle contient alors outre, la ou les séquences d'acide nucléique du 35 matériel biologique, un véhicule ou adjuvant

pharmaceutiquement acceptable et compatible avec des acides nucléiques.

Selon une deuxième forme de réalisation, le matériel biologique de l'invention comprend une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps, ladite séquence étant complexée ou conjuguée à une molécule ou substance porteuse favorisant sa pénétration dans les cellules cibles, comme des liposomes ou des vésicules lipidiques.

Selon une troisième forme de réalisation, le matériel biologique de l'invention comprend une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps, ladite séquence se présentant sous la forme d'un vecteur de transfert. Le vecteur dans lequel est incorporé le gène d'anticorps peut être un vecteur viral biologique, comme un rétrovirus, un adénovirus, un parvovirus ou tout autre vecteur permettant le transfert efficace *in vivo* du gène d'anticorps dans les cellules d'un mammifère. Une composition pharmaceutique à base de ce matériel biologique peut être administrée à un individu soit localement soit par voie systémique selon les méthodes

classiques de transfert de gène, par transfection d'ADN ou d'ARN ou infection par un virus.

Un quatrième mode de réalisation de l'invention relève d'une stratégie de transfert de gène par thérapie cellulaire mettant en oeuvre des cellules génétiquement modifiées. Dans ce mode de réalisation, le matériel biologique de l'invention est constitué de cellules ne produisent pas naturellement des anticorps, et se présentant sous une forme permettant leur incorporation dans l'organisme d'un mammifère ainsi qu'éventuellement leur culture préalable, lesdites cellules étant génétiquement modifiées par au moins une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci.

Le mode de réalisation précédent peut être mis en oeuvre selon deux variantes :

- Soit, les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps entrant dans la composition du matériel biologique de l'invention proviennent du mammifère à traiter. Dans cette variante, les cellules sont préparées par les techniques consacrées de la biologie cellulaire et moléculaire, comme par exemple, à partir de biopsies prélevées du patient à traiter, puis ces cellules sont modifiées génétiquement par la séquence d'acide nucléique portant le gène d'anticorps, soit par transfection soit par infection par un vecteur conforme à ceux décrits précédemment dans le cas d'un transfert de gène directement *in vivo*. Les compositions pharmaceutiques fabriquées à partir de ce matériel biologique sont administrées en retour au patient dont les cellules ont été prélevées.

- Soit, les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps entrant dans la composition du matériel biologique de l'invention proviennent d'un autre mammifère humain ou animal que celui à traiter.

5 Ces cellules ont été préparées comme dans la variante précédente. Dans le cas de cellules d'origine humaine, celles-ci proviennent de donneurs compatibles; dans le cas de cellules d'origine non-humaine, on utilise des cellules d'animaux génétiquement modifiées, comme le porc, rendues compatibles pour une greffe d'organe.

10

Les cellules précédentes se présentent sous une forme permettant leur implantation par tout moyen connu dans l'organisme du mammifère receveur. Elles peuvent en outre se présenter sous une forme ayant permis de les cultiver préalablement à la greffe. Il peut s'agir de tout support ou milieu de culture compatible avec leur administration et leur incorporation chez le receveur, comme par exemple une matrice du type de celle décrite dans la demande de brevet européen publiée sous le numéro 378 576 concernant des fibroblastes.

Dans le quatrième mode de réalisation, mais aussi pour la préparation des acide nucléiques entrant dans la composition des matériaux biologiques des autres mode de réalisation de l'invention, on choisit des cellules ne produisant pas naturellement des anticorps mais possédant :

- 30 - la capacité de pouvoir sécréter des protéines dans la circulation sanguine d'un mammifère;
- une longue durée de vie dans l'organisme du mammifère, avantageusement d'au moins plusieurs mois à plusieurs années jusqu'à la vie entière du patient.

Plus particulièrement pour le quatrième mode de réalisation de l'invention, ces cellules sont

choisies pour leur capacité à accepter facilement d'être prélevées, modifiées génétiquement *ex vivo* et implantées chez un mammifère.

5 Parmi les type cellulaires présentant les caractéristiques précédentes, l'invention envisage plus spécifiquement les kératinocytes, les hépatocytes, les fibroblastes de peau, les myoblastes, les cellules endothéliales et les cellules souches hématopoïétiques.

10 Il a été démontré de manière surprenante (Fenjves, E. S., Smith, J., Zaradic, S., et Teichman, L. B., Human Gene Therapy, 5, 1241-1248, 1994) que les kératinocytes pouvaient produire relativement efficacement des protéines vers l'organisme et non pas seulement vers l'extérieur. En outre, leur culture est 15 facile et en routine depuis plusieurs années dans les services hospitaliers pour les greffes de peau.

20 La manipulation des hépatocytes est plus difficile que celle des kératinocytes. Cependant, il a été montré (Grossman, M., Raper, S. E., Kozarsky, K., Stein, E. A., Engelhart, J. F., Müller, D., Lupien, P. J., Wilson, J. M., Nature Genetics, 6, 335-341, 1994 ; Ferry, N., Duplessis, O., Houssin, D., Danos, O., Heard J-M., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, 8377-8381, 1991) que les hépatocytes pouvaient être infectés par des 25 rétrovirus recombinants à la fois *ex vivo* et *in vivo*.

25 La culture et la transduction rétrovirale des fibroblastes de peau sont faciles (Moullier, P., Maréchal, V., Danos, O., Heard, J-M., Transplantation, 56, 427-432, 1993). La manipulation des organoïdes est aisée (Moulier et al., Nature Genetics, 4, june 1993, 154-159). Les fibroblastes présentent l'avantage d'être facilement prélevable chez un sujet par une simple opération chirurgicale. En outre, des protocoles de thérapie génique sont en préparation pour la correction 35 de déficits lysosomiaux chez les enfants.

Les myoblastes qui sont des cellules musculaires non différenciées, peuvent aussi être purifiés, et seront vraisemblablement utilisés sans modification génétique dans le cadre du traitement de certaines maladies dégénératives (Yao, S-N., Smith, K. J., et Kurachi, K., Gene Therapy, 1, 99-107, 1994).

La modification génétique de cellules endothéliales a déjà été réalisée pour produire des protéines thérapeutiques, par exemple dans la demande de brevet internationale PCT publiée sous le numéro WO 90 06997. Les cellules endothéliales, qui constituent la paroi des vaisseaux sanguins, sont donc particulièrement adaptées à la mise en oeuvre du matériel biologique de l'invention, dont le but est de faire sécréter, par les cellules génétiquement modifiées, les anticorps dans la circulation sanguine d'un mammifère.

D'autres types cellulaires peuvent être envisagés, telles que les cellules souches hématopoïétiques, dès lors qu'ils remplissent les caractéristiques définies plus haut.

Le matériel biologique de l'invention trouve son application dans la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter ou à prévenir les rechutes de cancers, et les infections ou expansions virales plus particulièrement le SIDA.

Le cancer touche environ une personne sur quatre dans les populations occidentales et les traitements disponibles aujourd'hui ne sont réellement satisfaisants que pour un patient sur deux.

Des maladies virales graves touchent de manière de plus en plus importante les populations humaines, on pense bien entendu plus particulièrement aux virus HIV, pour lequel on ne dispose à l'heure

actuelle d'aucun traitement efficace pour prévenir ou traiter l'infection.

Le matériel biologique de l'invention est remarquable en ce qu'il permet d'envisager une nouvelle approche thérapeutique de ces maladies très graves.

En effet, dans le cas des cancers, il permet à l'organisme de disposer sur le long terme d'anticorps spécifiques des cellules tumorales soit cytocides, soit induisant la dormance cellulaire. Ce but est atteint en utilisant des séquences d'acide nucléique portant un gène codant pour des anticorps dirigés contre un antigène spécifique de cellules tumorales.

Dans le cas des infections virales, le matériel biologique de l'invention permet à l'organisme de maintenir sur le long terme un niveau basal d'anticorps soit neutralisants pour les virus, soit cytocides pour les cellules infectées. Ce but est atteint en utilisant des séquences d'ADN codant pour des anticorps dirigés contre un antigène spécifique du virus responsable de la dite infection ou contre un antigène spécifique des cellules infectées par ledit virus.

La présente invention concerne donc aussi les compositions pharmaceutiques comprenant un matériel biologique tel que défini précédemment. Ces compositions peuvent contenir outre le matériel biologique de l'invention, des véhicules ou adjuvants classiquement utilisés. Les doses de matériel biologique entrant dans ces compositions pharmaceutiques sont adaptées au mode d'administration utilisée, à la pathologie visée, de la séquence d'acide nucléique mise en oeuvre et de sa forme de présentation, pour permettre la production et la sécrétion d'une quantité thérapeutiquement efficace de l'anticorps dans la circulation sanguine du sujet traité.

L'invention concerne aussi des cellules humaines ou non-humaines ne produisant pas naturellement des anticorps, mais génétiquement modifiées par au moins une séquence d'acide nucléique contenant un gène 5 d'anticorps thérapeutique et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère ayant reçu lesdites cellules d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un 10 fragment de celui-ci.

Ces cellules constituent un matériel biologique particulièrement adapté pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à une thérapie cellulaire *ex vivo* d'un individu.

15 Les cellules humaines précédentes, dès lors qu'elles ne proviennent pas du patient chez lequel elles sont implantées, ou les cellules animales, sont bien entendu, préalablement à leur implantation, traitées par tous moyens physiques ou génétiques, connus de l'homme du métier, pour être protégées du système immunitaire du 20 patient les recevant.

25 L'invention a encore pour objet l'utilisation d'un matériel biologique ou de cellules de précédents, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers ou d'infections virales. L'invention concerne aussi l'utilisation d'une séquence d'acides nucléiques 30 contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite 35 séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas

naturellement des anticorps, pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène. Plus particulièrement, cette utilisation vise la préparation de compositions pharmaceutiques destinées au traitement des cancers ou d'infections virales.

L'invention concerne enfin un procédé de fabrication d'une cellule génétiquement modifiée par au moins une séquence d'ADN codant pour un anticorps thérapeutique ou un fragment de cet anticorps, caractérisée en ce que l'on transfert par tout moyen approprié des séquences d'ADN codant pour un anticorps thérapeutique ou un fragment de cet anticorps, dans des cellules ne produisant pas naturellement des anticorps, puis en ce que l'on sélectionne parmi ces cellules celles génétiquement modifiées par ladite séquence d'ADN.

Outre les caractéristiques qui précèdent, l'invention comporte d'autres caractéristiques qui apparaîtront au cours de la description qui suit et qui se réfèrent à des exemples expérimentaux de réalisation et de mise en oeuvre de la présente invention, étant entendu que ces exemples ne sauraient constituer une quelconque limitation à la portée des revendications.

Les travaux rapportés ci-dessous ont permis de démontrer que :

- *in vitro* des cellules prélevables chez le patient, modifiables génétiquement *ex vivo* et réimplantables, qui ne produisent pas naturellement des anticorps, sont capables de sécréter des anticorps recombinants conservant les propriétés de l'anticorps d'origine,

- au moins un type cellulaire précédent est capable de sécréter *in vivo* des anticorps recombinants conservant les propriétés de l'anticorps d'origine.

5 - le matériel biologique de l'invention n'induit dans l'organisme modifié aucune réponse immunitaire neutralisant l'anticorps recombinant.

#### I - Définition de l'anticorps recombinant.

10 L'anticorps recombinant modèle utilisé pour les expériences de transfert de gène d'anticorps rapportées ci-après est un anticorps monoclonal de souris anti-thyroglobuline humaine (Tg10) (Piechaczyk et al., Hybridoma, vol. 4, 4, (1985), 361-367). Son clonage 15 moléculaire et la caractérisation fonctionnelle des ADN complémentaires de sa chaîne lourde et de sa chaîne légère ont été effectués comme indiqué ci-après.

20 La thyroglobuline est une glycoprotéine iodée de haut poids moléculaire impliquée dans la synthèse, le stockage et la sécrétion des hormones thyroïdiques T3 et T4 (Marriq, C., C. Arnaud, M. Rolland, and S. Lissitzky. 1980. Eur. J. Biochem. 111:3347). Un anticorps monoclonal de souris, désigné 25 ci-après Tg10, dirigé contre une région antigénique (région II) fréquemment reconnu par des autoanticorps naturels chez les patients atteints de maladie de Grave, de la thyroïdite de Hashimoto et des carcinomes de la thyroïde, a été établi par des membres du laboratoire 30 CNRS UMR 9921 de la Faculté de pharmacie de Montpellier, Avenue Charles Flahaut, 34060, Montpellier Cedex 01, France (Piechaczyk et al., Hybridoma, vol. 4, 4, (1985), 361-367). Les ADN complémentaires des chaînes légères (Kappa) et lourde (IgG1) de l'anticorps Tg10 ont 35 été clonés dans le vecteur pSPORT1 (Gibco/BRL) par les

techniques consacrées du génier génétique (Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA). Les séquences nucléotidiques des parties variables des chaînes lourdes et légères qui spécifient chacune des chaînes d'anticorps ont été déterminées et sont représentées respectivement aux figures 1 et 2 en annexe. Le clonage et le séquençage des ADNC de l'anticorps Tg10 ont été effectués au laboratoire sus-mentionné.

Pour leur caractérisation fonctionnelle, les ADNC de la chaîne légère et de la chaîne lourde de l'anticorps Tg10 ont été clonés dans le vecteur rétroviral pLXPXSN (Morgan, R. A., L. Couture, O. Elroy-Stein, J. Ragheb, B. Moss, and W. F. Anderson. 1992. Nucl. Acids Res 20:1293-1299) soit de part et d'autre de la séquence IRES du poliovirus endogène à ce vecteur pour former les vecteurs PM130, soit individuellement en amont de la séquence IRES pour former les vecteurs PM117 et PM124, comme représenté à la figure 3 en annexe). Les cellules simiennes COS-7 (ATCC CRL 1651) ont ensuite été transfectées par la technique au phosphate de calcium soit par PM130 seul, soit par la combinaison PM117+PM124. La présence dans les surnageants de culture d'anticorps réactifs contre la thyroglobuline humaine a été testée par la technique ELISA (Piechaczyk et al., Hybridoma, vol. 4, 4, (1985), 361-367). En outre, les constantes cinétiques d'association et de dissociation de l'anticorps recombinant Tg10 produit par les cellules COS-7 avec la thyroglobuline ont été déterminées à partir des surnageants de culture par résonance plasmonique de surface (Fagerstam, L. G., and R. Karlsson. 1993. Biosensor techniques. In Immunochemistry. V. Oss and M. vanRegenmortel, eds. M

Dekker Inc. p.949-970) suivant la technique Biacore développée par la société Pharmaci Biosensor.

5 Les valeur de ces constantes sont rapportées dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

Anticorps	Constante cinétique d'association $k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	Constante cinétique de dissociation $k_{off}$ ( $s^{-1}$ )	Constante d'affinité $K_a$
Anticorps Tg10 naturel	$4,6 \pm 0,1 \times 10^5$	$5,3 \pm 0,2 \times 10^{-5}$	$8,6 \pm 0,4 \times 10^9$
Anticorps Tg10 recombinant (PM117+PM124)	$1,4 \pm 0,3 \times 10^5$	$4,3 \pm 1,0 \times 10^{-5}$	$3,2 \pm 1,4 \times 10^9$
Anticorps Tg10 recombinant (PM130)	$2,1 \pm 1,5 \times 10^5$	$6,0 \pm 0,4 \times 10^{-5}$	$3,5 \pm 2,7 \times 10^9$
Chaîne lourde de l'anticorps Tg10 recombinant (PM117+PM124)	$1,0 \pm 0,3 \times 10^5$	$3,0 \pm 0,2 \times 10^{-4}$	$3,3 \pm 1,2 \times 10^8$

10 De façon surprenante, le tableau 1 montre que la chaîne lourde synthétisée seule à partir de PM124 est sécrétée par les cellules COS-7 et reconnaît la thyroglobuline humaine avec une affinité diminuée seulement de 10 fois par rapport à l'anticorps complet.

15 II - Lignées productrices de rétrovirus.

La plupart des cellules primaires sont extrêmement sensibles aux méthodes de transfection classiques. En outre, la durée de vie, et donc 20 l'expression, de l'ADN transfété est en général très courte dans la plupart des cellules transfectées.

Pour permettre une infection efficace de types cellulaires variés et une expression sur le long terme de l'anticorps Tg10 dans les cellules

génétiquement modifiées, une lignée cellulaire productrice de rétrovirus recombinants véhiculant et exprimant les ADNc de l'anticorps Tg10 a été établie.

5 Les cellules d'empaquetage rétroviral amphotrope PA 317 (Miller, D. and Buttimore, 1986, Molec. Cell Biol. 6, 2895-2902) ont été transfectées par la technique du précipité au phosphate de calcium par le vecteur rétroviral PM130. Plusieurs clones producteurs stables ont été établis. La lignée PA130.10 a été  
10 utilisée pour les expériences d'infection ultérieures. Son titre en virus, dosé sur la lignée indicatrice NIH 3T3 (Miller, D. and Buttimore, 1986, Molec. Cell Biol. 6, 2895-2902) a été de  $10^4$  cfu/ml.

15 III - Expériences *in vitro*.

Les rétrovirus produits par la lignée PA130.10 ont été utilisés pour infecter différentes lignées cellulaires établies représentatives de différents types cellulaires disponibles auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) :

- 20
- lignée NIH3T3 de fibroblastes murins;
  - lignée A431 de kératinocytes humains;
  - lignée HepG2 d'hépatocytes humains;
  - 25 - lignée C2C12 de myoblastes.

Différents clones cellulaires ont été dérivés pour chaque type de transduction rétrovirale et l'anticorps Tg10 produit dans le surnageant de culture a été dosé par ELISA. Les résultats obtenus sont rapportés  
30 dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2

Lignées	Anticorps Tg10
Lignée NIH3T3	88 +/- 65 ng / $10^5$ cellules / 24hrs
Lignée A431	35 +/- 6 ng / $10^5$ cellules / 24hrs
Lignée HepG2	3,5 +/- 1,5 ng / $10^5$ cellules / 24hrs
Lignée C2C12	2 +/- 0,6 ng / $10^5$ cellules / 24hrs

En outre, dans le cas des myoblastes C2C12  
5 différenciés in vitro en myotubes la production est conservée.

Les propriétés thermodynamiques et cinétiques des anticorps produits par ces différents types cellulaires déterminées par résonance plasmonique  
10 de surface selon la technologie BIACore (Pharmacia Biosensor) se sont révélées être identiques à celles de l'anticorps Tg10 de départ.

Les vecteurs rétroviraux ont dans un second temps été utilisés pour infecter des fibroblastes primaires de peau de souris (infection rétrovirale et des hépatocytes humains (transfection). Les productions en anticorps ont été respectivement de :

- 10 à 20 ng /  $10^5$  cellules / 3 jours, et de
- 1 à 10 ng /  $10^5$  cellules / 4 jours.

De même, les caractéristiques des anticorps produits ont été les mêmes que celles de l'anticorps de départ.

#### IV - Expérience in vivo.

25

Des cellules C2C12 modifiées génétiquement et qui ont conservé la capacité de se différencier en myotubes ont été implantées par injection dans les jambiers antérieurs de 4 souris syngéniques C3H à raison de  $10^7$  cellules par jambier.

Chez 3 des 4 souris, la production d'anticorps recombinants ayant conservé les propriétés thermodynamique et la propriété de reconnaissance de l'antigène de l'anticorps de départ a été suivie pendant 5 deux mois. La quantité d'anticorps produite s'est régulièrement élevée du niveau de base à une production d'environ 100 ng/ml de sérum.

10 V - Absence de réponse immunitaire neutralisant l'anticorps recombinant.

Un des buts essentiels de l'invention est de faire produire de manière systémique un anticorps recombinant, avantageusement thérapeutique par des 15 cellules génétiquement modifiées de mammifère.

Un risque possible de cette approche est l'induction d'une réponse immunitaire de la part de l'organisme modifié pouvant entraîner la neutralisation de l'anticorps recombinant.

20 Cette objection a été écartée par les résultats expérimentaux présentés ci-dessous.

25 2 x 10<sup>7</sup> cellules myogéniques primaires exprimant de façon stable l'anticorps monoclonal Tg10 après transduction rétrovirale sont implantées au niveau du *tibialis anterior* de souris C3H. Le sérum des souris est prélevé à des intervalles d'une semaine pendant plusieurs mois. La quantité d'anticorps Tg10 secrétés est dosée par la méthode ELISA. En parallèle, la 30 quantité d'anticorps anti-idiotype est déterminée par ELISA.

35 Dans une série de 5 souris, la sécrétion de l'anticorps Tg10 s'est située entre 100 et 300 ng/ml de sérum pendant 4 mois. Aucune réponse anti-idiotype n'a pu être détectée dans ces conditions.

## REVENDICATIONS.

1) Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène, comprenant, soit au moins une séquence d'acide nucléique contenant un gène thérapeutique et se présentant sous une forme permettant le transfert *in vivo* dudit gène dans des cellules de mammifère, soit au moins une cellule de mammifère ne produisant pas naturellement des anticorps, génétiquement modifiée *in vitro* par au moins une séquence d'acide nucléique précédente, et se présentant sous une forme permettant son incorporation dans l'organisme d'un mammifère ainsi qu'éventuellement sa culture préalable, caractérisé en ce que ladite séquence d'acides nucléiques contient un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps.

2) Matériel biologique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps, ladite séquence se

présentant sous la forme d'une séquence d'ADN ou d'ARN nue.

5                   3) Matériel biologique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace  
10                 de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps, ladite séquence étant complexée ou conjuguée à une molécule ou substance  
15                 porteuse.

20                 4) Matériel biologique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par  
25                 ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps, ladite séquence étant un vecteur permettant le transfert efficace *in vivo* du gène d'anticorps dans des cellules.

30                 5) Matériel biologique selon la revendication 4, caractérisé en ce que le vecteur est un vecteur viral biologique.

35                 6) Matériel biologique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué

de cellules ne produisent pas naturellement des anticorps, sous une forme permettant leur incorporation dans l'organisme d'un mammifère ainsi qu'éventuellement leur culture préalable, lesdites cellules étant 5 génétiquement modifiées par au moins une séquence d'acides nucléiques contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace 10 de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci.

7) Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène, selon la revendication 15 6, caractérisé en ce que les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps proviennent du mammifère à traiter.

8) Matériel biologique pour la préparation 20 de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène, selon la revendication 6, caractérisé en ce que les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps proviennent d'un autre mammifère que celui à traiter et ont subit un traitement 25 les rendant compatibles.

9) Matériel biologique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé 30 en ce que les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps sont choisies parmi celles possédant :

- la capacité de pouvoir sécréter des protéines dans la circulation sanguine d'un mammifère;
- une longue durée de vie dans l'organisme d'un mammifère.

10) Matériel biologique selon la revendication 9, caractérisé en ce que les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps sont choisies parmi celles acceptant facilement d'être prélevées, 5 modifiées génétiquement *ex vivo* et implantées chez un mammifère.

10 11) Matériel biologique selon l'une quelconque des revendications 9 et 10, caractérisé en ce que les cellules ne produisant pas naturellement des anticorps sont choisies parmi les kératinocytes, les hépatocytes, les fibroblastes de peau, les myoblastes, les cellules endothéliales et les cellules souches hématopoïétiques.

15

12) Matériel biologique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le gène d'anticorps est un gène codant pour un anticorps natif, un fragment ou un dérivé de cet anticorps tel qu'un anticorps chimérique.

25

13) Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter ou à prévenir un cancer chez un sujet, selon la revendication 12, caractérisé en ce que ledit anticorps, fragment ou dérivé d'anticorps est dirigé contre un antigène spécifique de cellules tumorales.

30

14) Matériel biologique pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter ou à prévenir une infection ou une expansion virale chez un sujet, selon la revendication 12, caractérisé en ce que ledit anticorps fragment ou dérivé d'anticorps est dirigé contre un antigène spécifique du virus

responsable de la dite infection ou contre un antigène spécifique des cellules infectées par ledit virus.

5           15) Composition pharmaceutique comprenant un matériel biologique selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 avantageusement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

10          16) Cellule humaine ou non ne produisant pas naturellement des anticorps, caractérisée en ce qu'elle est génétiquement modifiée par au moins une séquence d'acide nucléique contenant un gène d'anticorps thérapeutique et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère ayant reçu lesdites cellules d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci.

20          17) Utilisation d'un matériel biologique selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 ou de cellules selon la revendication 16, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers ou d'infections virales.

25          18) Utilisation d'une séquence d'acide nucléiques contenant un gène d'anticorps et des éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas naturellement des anticorps, pour la préparation de compositions pharmaceutiques destinées à traiter un mammifère par transfert de gène.

19) Utilisation selon la revendication 18,  
pour la préparation d'une composition pharmaceutique  
destinée au traitement des cancers ou d'infections  
virales.

5

20) Procédé de fabrication d'une cellule  
selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'on  
transfert par tout moyen approprié au moins une séquence  
d'acides nucléiques contenant un gène d'anticorps et des  
10 éléments assurant l'expression *in vivo* dudit gène  
d'anticorps et la sécrétion dans la circulation sanguine  
d'un mammifère d'une quantité thérapeutiquement efficace  
de cet anticorps ou d'un fragment de celui-ci, par des  
cellules dudit mammifère génétiquement modifiées par  
15 ladite séquence d'acides nucléiques et ne produisant pas  
naturellement des anticorps dans des cellules ne  
produisant pas naturellement des anticorps, puis en ce  
que l'on sélectionne parmi ces cellules celles  
génétiquement modifiées par ladite séquence d'acide  
20 nucléique.

1/5

Fig.1a

ATG GGT TGG CTG TGG AAC TTG CTA TTC CTG ATG GCA GCT GCC CAA AGT GCC CAA GGA CG  
M G W L W N L L F L M A A Q S A Q G Q  
-20 -10 -1 1

ATC CAC TTG GTA CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC  
I H L V Q S G P E L K K P G E T V K I S  
10 20

TGC AAG GCT TCT GGG TAT ACC TTC ACA TCG TAT GGC TTG ACC TGG GTG ATA CAG TCT CCA  
C K A S G Y F T S Y G L T W V I Q S P  
30 40

GGA AAG GAT TTA AAA TGG ATG GGC TGG ATA AAC ACC TTC TCT GGA GTG CCA ACA TAT GCT  
G K D L K W M G W I N Y F S G V P T Y A  
52 52A 60

2 / 5

Fig. 1b

3/5

Fig.2a

ATG	AAG	TTG	CCT	GGT	AGG	CTG	TTG	GTG	CTG	ATG	TTC	TGG	AAT	CCT	GCT	TCC	AAT	AGT	AAT
M	K	L	P	G	R	L	L	V	L	M	F	W	I	P	A	S	N	S	N
-19																		-1	1
GTT	GTG	ATG	ACC	CAA	ACT	CCA	CTC	TCC	CTG	TCT	GTC	AGT	CTT	GGA	GAT	CAA	GCC	TCC	ATC
V	V	M	T	Q	T	P	L	S	L	S	V	S	L	G	D	Q	A	S	I
TCT	TGC	AGA	TCT	AGT	CAG	AGC	ATT	GTA	CAT	AGT	AAT	GGA	AAC	ACC	TAT	TTA	GAA	TGG	TAC
S	C	R	S	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	Y	L	E	W	Y
27	27A	27B	27C	27D	27E														
CTG	CAG	AAA	CCA	GGC	CAG	TCT	CCA	AAG	CTG	CTG	ATC	TAT	AAA	GTT	TCC	AAC	CGA	TTG	TCT
L	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	L	S
40																			
50																			

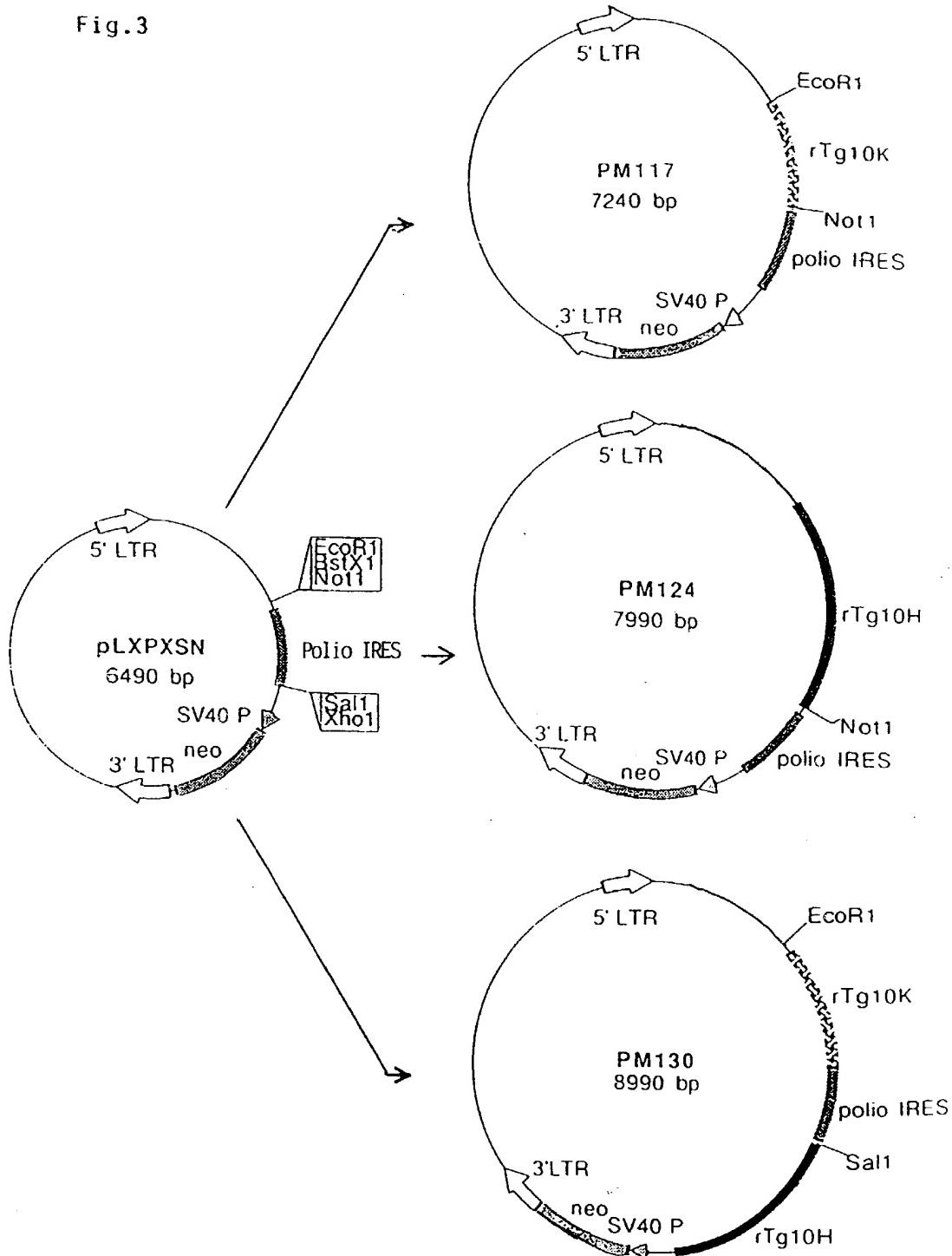
4/5

Fig.2b

GGG GTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAC TTC ACA CTC AAA ATC AGC  
G V P D R F S G S G T D F T L K I S  
60  
AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA CTT TAT TAC TGT TTT CAA GGT TCA CAT ATT CCA TTC  
R V E A E D L G L Y Y C F Q G S H I P F  
80  
ACG TTC GGT TCG GGG ACA AAG TTC GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA ACT GTA TCC  
T F G S G T K L E I K R A D A A P T V S  
100  
110

5/5

Fig.3



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/FR 98/00081

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC 6 C12N15/13 A61K31/70 A61K48/00 C12N5/10		
<p>According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC</p>		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</p> <p>IPC 6 A61K C07K</p>		
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p>		
<p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)</p>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 90 06997 A (U.S. GOVERNMENT) 28 June 1990 see example 1 see claims</p> <p>---</p>	1-18
A	<p>E. FENJVES ET AL.: "Systemic delivery of secreted protein by grafts of epidermal keratinocytes: Prospects for keratinocyte gene therapy." HUMAN GENE THERAPY, vol. 5, no. 10, October 1994, NEW YORK, NY, TATS-UNIS, pages 1241-1248, XP002044923 cited in the application see the whole document</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search  7 May 1998		Date of mailing of the international search report  20/05/1998
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Nooij, F

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Int'l. Jonal Application No
PCT/FR 98/00081

**C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	K. KATO ET AL.: "Local production of the p40 subunit of interleukin 12 suppresses T-helper 1-mediated immune responses and prevents allogeneic myoblast rejection." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 93, no. 17, 20 August 1996, WASHINGTON, DC, TATS-UNIS, pages 9085-9089, XP002044924 see abstract ---	1-18
A	D. NOEL ET AL.: "Analysis of the individual contributions of immunoglobulin heavy and light chains to the binding of antigen using cell transfection and plasmon resonance analysis." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 193, no. 2, 21 June 1996, AMSTERDAM, PAYS BAS, pages 177-187, XP002044925 see abstract see figure 1 ---	1-18
A	R. BEERLI ET AL.: "Intracellular expression of single chain antibodies reverts ErbB-2 transformation." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 39, 30 September 1994, BALTIMORE, MD, TATS-UNIS, pages 23931-23936, XP002044926 see abstract ---	1-18
A	S. AGER ET AL.: "Retroviral display of antibody fragments; Interdomain spacing strongly influences vector infectivity." HUMAN GENE THERAPY, vol. 7, no. 17, 10 November 1996, NEW YORK, NY, TATS-UNIS, pages 2157-2164, XP002044927 see abstract see figure 4 ---	1-18
A	FR 2 706 486 A (RHONE-POULENC RORER S.A.) 23 December 1994 see examples see claims ---	1-18
P,X	D. NOEL ET AL.: "In vitro and in vivo secretion of cloned antibodies by genetically modified myogenic cells." HUMAN GENE THERAPY, vol. 8, no. 10, 1 July 1997, NEW YORK, NY, TATS-UNIS, pages 1219-1229, XP002044928 see the whole document ---	1-18

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No	
PCT/FR 98/00081	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9006997	A 28-06-1990	CA 2005199 A		13-06-1990
		EP 0456640 A		21-11-1991
		JP 4507041 T		10-12-1992
FR 2706486	A 23-12-1994	AU 7076394 A		03-01-1995
		BR 9407512 A		07-01-1997
		CA 2165458 A		22-12-1994
		CN 1126491 A		10-07-1996
		CZ 9503295 A		13-03-1996
		EP 0703980 A		03-04-1996
		FI 956057 A		15-12-1995
		WO 9429446 A		22-12-1994
		HU 74266 A		28-11-1996
		JP 8511162 T		26-11-1996
		NO 955011 A		11-12-1995
		PL 312213 A		01-04-1996
		SK 156895 A		08-05-1996
		ZA 9404303 A		14-02-1995

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De .de Internationale No  
PCT/FR 98/00081

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/13 A61K31/70 A61K48/00 C12N5/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 90 06997 A (U.S. GOVERNMENT) 28 juin 1990 voir exemple 1 voir revendications	1-18
A	E. FENJVES ET AL.: "Systemic delivery of secreted protein by grafts of epidermal keratinocytes: Prospects for keratinocyte gene therapy." HUMAN GENE THERAPY, vol. 5, no. 10, octobre 1994, NEW YORK, NY, TATS-UNIS, pages 1241-1248, XP002044923 cité dans la demande voir le document en entier	1-18

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date déposé international ou après cette date
- "L" document pouvant porter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  7 mai 1998	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  20/05/1998
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé  Nooij, F

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Dépôt Internationale No  
PCT/FR 98/00081

**C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	K. KATO ET AL.: "Local production of the p40 subunit of interleukin 12 suppresses T-helper 1-mediated immune responses and prevents allogeneic myoblast rejection." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 93, no. 17, 20 août 1996, WASHINGTON, DC, TATS-UNIS, pages 9085-9089, XP002044924 voir abrégé ---	1-18
A	D. NOEL ET AL.: "Analysis of the individual contributions of immunoglobulin heavy and light chains to the binding of antigen using cell transfection and plasmon resonance analysis." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 193, no. 2, 21 juin 1996, AMSTERDAM, PAYS BAS, pages 177-187, XP002044925 voir abrégé voir figure 1 ---	1-18
A	R. BEERLI ET AL.: "Intracellular expression of single chain antibodies reverts ErbB-2 transformation." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 39, 30 septembre 1994, BALTIMORE, MD, TATS-UNIS, pages 23931-23936, XP002044926 voir abrégé ---	1-18
A	S. ÅGER ET AL.: "Retroviral display of antibody fragments; Interdomain spacing strongly influences vector infectivity." HUMAN GENE THERAPY, vol. 7, no. 17, 10 novembre 1996, NEW YORK, NY, TATS-UNIS, pages 2157-2164, XP002044927 voir abrégé voir figure 4 ---	1-18
A	FR 2 706 486 A (RHÔNE-POULENC RORER S.A.) 23 décembre 1994 voir exemples voir revendications ---	1-18
P,X	D. NOEL ET AL.: "In vitro and in vivo secretion of cloned antibodies by genetically modified myogenic cells." HUMAN GENE THERAPY, vol. 8, no. 10, 1 juillet 1997, NEW YORK, NY, TATS-UNIS, pages 1219-1229, XP002044928 voir le document en entier -----	1-18

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De ..de Internationale No  
PCT/FR 98/00081

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9006997	A	28-06-1990	CA 2005199 A EP 0456640 A JP 4507041 T	13-06-1990 21-11-1991 10-12-1992
FR 2706486	A	23-12-1994	AU 7076394 A BR 9407512 A CA 2165458 A CN 1126491 A CZ 9503295 A EP 0703980 A FI 956057 A WO 9429446 A HU 74266 A JP 8511162 T NO 955011 A PL 312213 A SK 156895 A ZA 9404303 A	03-01-1995 07-01-1997 22-12-1994 10-07-1996 13-03-1996 03-04-1996 15-12-1995 22-12-1994 28-11-1996 26-11-1996 11-12-1995 01-04-1996 08-05-1996 14-02-1995